

A daganatos betegellátás innovatív fejlesztése genomikai módszerekkel

Beszámoló a Nemzeti Onkológiai Konzorcium 2006. évi tevékenységéről

Tímár József¹, Kásler Miklós¹, Kátai József², Soós Miklós³, Mathiasz Dóra⁴,
Romány Anna⁵, Patthy László⁶, Kovács Gábor⁷, Józsa Adrienn⁸,
Szilák László⁹, Forrai Tamás¹⁰

¹Országos Onkológiai Intézet, Budapest, ²AstraZeneca Kft., Törökbálint, ³Auro-Science Kft., Budapest,
⁴GlaxoSmithKline Kft., Budapest, ⁵Janssen-Cilag Kft., Törökbálint,
⁶MTA-SZBK Enzimológiai Intézet, Budapest, ⁷Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet, Budapest,
⁸Roche (Magyarország) Kft., Budaörs, ⁹Szilak Labor Kft., Szeged, ¹⁰Zenon Bio Kft., Szeged

A Konzorcium egyik alapvető célja a molekuláris diagnosztikai szolgáltatások fejlesztése. Ennek keretében az örökletes daganatok körében a polipózis és a nem-polipózis talaján kialakuló vastagbélrákok esetében a szóba jöhető valamennyi gén hibájára nézve beállítottunk eljárásokat (APC, MYH, STK11, SMAD4, MLH1, MSH2), melyeket nagy beteganyagban alkalmaztunk, míg a familiáris hererákok esetében nemzetközi együttműködésben az Y kromoszóma gr/gr régiójának hibájára hívtuk fel a figyelmet. Follikuláris limfómákban a minimális reziduális betegség monitorozására érzékeny qPCR módszert dolgoztunk ki a Bcl-2/IgH fúziós szekvencia meghatározására. A daganaterozódás témakörében új immuncitokémiai és molekuláris biológiai eljárást dolgoztunk ki a periférán keringő endoteliális prekursor sejtek kimutatására, melyeket tüdőrákos betegekben teszteltünk. Megállapítottuk, hogy a módszer alkalmas a tumor angiogén fenotípusának jellemzésére és prognosztikus eszköz is lehet. Melanóma-genomikai vizsgálataink során több új melanóma-marker gént teszteltünk, melyek közül a rianodinreceptor ígéretesnek tűnik, míg a P2X7 purinerg receptor funkcionális szerepe lehet érdekes. Korábbi vizsgálataink folytatásaként klinikai mintákon teszteljük az általunk meghatározott metasztatikus melanóma-génmintázatot. Meghatároztuk a HER-2-amplifikált emlőrákok tirozinkináz-mintázatait és azt is bizonyítottuk, hogy az eltérő anatómiai lokalizációjú fej-nyaki daganatok eltérő kináz-mintázattal rendelkeznek. Szintén korábbi, az alacsony molekulatömegű heparinnal végzett vizsgálatok folytatásaként azonosítottunk 4-8-12 oligoszacharid méretű heparinfragmenteket, melyek motilitásgátlók és antimetasztatikusak kísérleti rendszerben. Farmakogenomikai vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a kolorektális rákos betegek szerin-hidroximetil-transzferáz (SHMT) génpolimorfizmusai az 5-FU és főleg a FOLFIRI-kezelések sikerét jelentősen befolyásolják, így az eljárás hatékony és költségtakarékos kezelési séma meghatározását teszi lehetővé. *Magyar Onkológia 50:349-359, 2006*

Research on developing molecular diagnostics for hereditary cancers resulted in establishing diagnostic services for familial polyposis and non-polyposis patients (mutation determination of APC, MYH, STK11, SMAD4, MLH1, MSH2). In familial testicular cancers the role of gr/gr gene on Y chromosome was identified. Molecular diagnostic tool was established to monitor the progression of follicular lymphoma using Bcl-2/IgH fusion sequences. Molecular diagnostic tools were developed to monitor circulating endothelial precursor cells (CEP) as well and the technique was tested in lung cancer patients. In malignant melanoma we have tested several potential novel markers among which ryanodine receptor seems to be a promising one, while the functional P2X7 receptor may serve as a therapeutic target. We have determined the tyrosine kinase „kinome” profile of HER-2-amplified breast cancers. Furthermore, the „kinome” profile was found to be characteristic for head and neck cancers of various anatomical location. Based on previous studies on the antimigratory and antimetastatic potential of low-molecular-weight heparins, we have identified short heparin-derived oligosaccharides with maintained antimetastatic- but non-anticoagulant potentials. Pharmacogenomic studies on the role of polymorphism of the serine-hydroxymethyl-transferase (SHMT) gene in the efficacy of 5-FU and FOLFIRI protocols of colorectal cancer patients revealed a significant effect resulting in altered overall survival as well. *Tímár J, Kásler M, Kátai J, Soós M, Mathiasz D, Romány A, Patthy L, Kovács G, Józsa A, Szilák L, Forrai T. Developments in cancer management by innovative genomics. 2006 report of the National Cancer Consortium. Hungarian Oncology 50:349-359, 2006*

Közlésre érkezett: 2006. szeptember 30.
Elfogadva: 2006. november 20.

Levelezési cím: Dr. Timár József, Országos Onkológiai Intézet, 1122 Budapest, Ráth György u. 7-9.
Telefon: 1-224-8786, Fax: 1-224-8706, e-mail: jtimar@oncol.hu

A kutatásokat az NKTH a Jedlik program keretében támogatja (NKFP1a-0024-05).

Bevezetés

Hazánkban évente több mint 30 000 ember hal meg daganatos megbetegedésben, amely mindkét nemet egyformán sújtja. Számos daganatféleség esetében hazánk az európai mortalitási és morbiditási statisztikákban is vezető helyet tölt be, így tüdő-, vastagbélrák és fej-nyaki daganatok vonatkozásában, de előkelő helyen állunk az emlőrákok esetében is. Az elmúlt évtizedek során a daganatos halálozás hazánkban dinamikusan emelkedett, mely trend csak az utóbbi néhány évben látszik megtörni. E szomorú statisztikai adatok annak ellenére helyezik hazánkat az európai listák élére, hogy egyre nagyobb társadalmi és szakmai figyelem övezi a kérdést, és egyre nagyobb anyagi erőket mozgat meg a társadalmat a betegség felderítésére, diagnosztikájára és terápiájára. Bár a daganat elleni küzdelem legsikeresebb módja kialakulásának megelőzése, hazánkban több mint 150 000 daganatos beteggel kell számolnunk, akiknek sorsát a gondos és hatékony kezelés dönti el. Bár egyes tumorféleségek mai eszközeinkkel is már gyógyíthatóvá váltak (gyermekkorai ALL, hererák, Wilms-tumor), a felnőttkori rosszindulatú daganatos megbetegedések esetében még a legjobb esetben sem tudjuk a betegek felét megmenteni, s egyes esetekben esélyeink ennél sokkal rosszabbak (tüdőrák, melanóma). 2001-ben létrejött a Nemzeti Onkológiai Kutatás-fejlesztési Konzorcium, mely az Országos Onkológiai Intézet (OOI) vezetésével szerteágazó daganatkutatási programot valósított meg, melynek eredményei folyamatosan jelentek meg a Magyar Onkológia hasábjain (1-3). A munkát az NKTH a Széchenyi program keretében támogatta 2001-2004 között.

A 2001-2004 közötti periódusban a Konzorcium az emlőrákokra vonatkozó kutatások keretében az örökletes daganatokban szerepet játszó BRCA1 gén hazai mutációs sajátosságait illetve splicing-mechanizmusainak részleteit tisztázta. Sporadikus emlődaganatok esetében kiderült, hogy a szövettani típustól függően érintettek a DNS-repair-gének. Csontáttétképzésre hajlamos daganatokban az NM23 metasztázis-szuppresszor csökkent expresszióját és a c-met, c-erbB2 és p53 fokozott expresszióját észleltük. Ugyanakkor megállapítottuk, hogy az áttétek c-erbB2 genotípusa nem feltétlenül egyezik a primer tumoréval, ami a Herceptin-terápia indikációs feltételeinek átgondolását igényli. A chip-technológia és mennyiségi PCR-technikák bevezetésével lehetőség nyílt a daganatok terápiás érzékenységnek előzetes becslésére.

A vastagbélrákra vonatkozó kutatásaink során epidemiológiai vizsgálataink felderítették kistérségi előfordulásának egyenetlenségeit, amelyek ún. klasztereket mutattak Budapesten, Heves, Jász-Nagykun-Szolnok, Nógrád, Komárom-Esztergom és Baranya megyékben, míg a végbélrák a Dunántúl egyes megyéiben halmozódott. Miután ez az egyik leggyakoribb rosszindulatú daganat mindkét nemben, igen nagy a jelentősége a hatékony szűrésnek, aminek alapja a rejtett bélvérzés kimutatása, mely célból laktoferrin-tesztet illetve egy ket-tős-antitestes módszert dolgoztunk ki, szabadal-

mazzattunk és teszteltünk nagyszámú beteganyagon. A sporadikus vastagbél-daganatok genetikai hátterére vonatkozó vizsgálataink azt mutatták, hogy a mikroszatellita-instabilitás nemcsak allévesztés révén, hanem hipermetiláció útján is kialakulhat. Ugyanez a metilációs mechanizmus gyakran játszik szerepet az APC és E-cadherin szuppresszor-gének inaktiválódásában is. Bemutattuk, hogy a vastagbélrák progressziójában a c-met gén fokozott expressziója játszik szerepet, ezért ezt prognosztikus markerként is fel lehet használni. A vastagbél-daganatok terápiájának alapját képező 5-FU molekuláris targetjének (TS) vizsgálata során meghatároztuk a gén hazai polimorfizmusának mintázatát és annak összefüggését a terápiás érzékenységgel, illetve a betegség prognózisával.

A fej-nyaki daganatokat nagyszámú beteg esetében vizsgáltuk keresve az egyre növekvő hazai incidencia genetikai hátterét. Megállapítottuk, hogy az MTHFR DNS-metilációs enzim génjének polimorfizmusai eltérő szerepet játszhatnak (védő illetve elősegítő tényezők) a daganat kialakulása szempontjából. Ugyancsak fontos megfigyelés ebből a szempontból az, hogy a hazai fej-nyaki rákok 40%-ában mutatható ki a HPV vírus, ami felveti etiológiai szerepét. A már kialakult daganatokban igen gyakori lokális immunszuppressziót detektáltunk. A fej-nyaki laphámrákok jelentős részében funkcionális ösztrogénreceptor-expressziót igazoltunk. Megállapítottuk, hogy e daganatféleség radioterápiájának hatékonyságát a daganatos erekre gyakorolt hatás alapján már korán mérni lehet.

A melanóma progressziója molekuláris hátterének kutatása során több klinikailag is tesztelt progressziós markert azonosítottunk (α IIb β 3 integrin, CD44v3 proteoglikán, AMF-receptor). A malignus melanómára vonatkozó kutatások során sikerrel alkalmaztuk a DNS-chip technikát új melanóma-specifikus (4 gén) és a melanóma-progresszióban szerepet játszó gének azonosítására. Preklinikai vizsgálatokban 3 gyógyszer esetében sikerült specifikus antimetasztatikus hatást igazolni: az alacsony molekulásúlyú heparin, az ösztrogén-metabolit 2-metoxiösztradiol valamint az erythropoetin- α (EPO) esetében (ez utóbbinak vaszkuláris perfúzió-növelő hatása látszik döntőnek). Ezek alapján a heparin- és EPO-terápia indikációs területeinek megváltoztatását javasoltuk. Kutatási eredményeinket csaknem 100 idegen nyelvű közlemény, egy szabadalom, számos újonnan bevezetett diagnosztikus eljárás és több gyógyszer alkalmazásának kiszélesítésére vonatkozó javaslat fémjelezte.

A Konzorcium ipari partnerei jóvoltából a kutatások nem álltak le teljesen 2005-ben, és mintegy új erőre kaptak a Jedlik program támogatásának elnyerésével. A Konzorcium az új kiíráshoz alkalmazkodva átalakult és egy lényegesen koncentráltabb, termék-orientált programot dolgozott ki. Az elmúlt években paradigmaváltás történt az onkológiában, mert a genomika eredményei megkezdték a korábban használt diagnosztikus és terápiás protokollok átalakítását. Ezek az eredmények a daganatkutatás minden területén

forradalmi változásokat generálnak, ami lassan, de biztosan egyre inkább átalakítja a mindennapi klinikai rutint is. Hatásai meg kell, hogy nyilvánuljanak a primer prevencióban illetve korai szűrésben, de lassan szinte új tudományt kell formáljanak a talán legkonzervatívabb szakmából, a patológiából is. Ahogyan az alap kutatások előrehaladnak, ezek eredményei kezdenek beépülni a diagnosztikába is. Úgy tűnik, hogy az új klinikai onkológia egyik alappillére az ún. molekuláris célzás (targetálás) elve lesz. Ennek az elvnek a mindennapi diagnosztikus és terápiás gyakorlatba való átültetése az egyik legfontosabb célja az új kutatás-fejlesztési programnak, mely a nagy hazai gyakoriságú daganatfélésekre koncentrálna (emlő-, vastagbél-, tüdő-, fej-nyaki rákok, melanóma). A fejlesztéseket négy programcsomagba integráltuk, melyek az alábbiak:

1. Molekuláris diagnosztikai szolgáltatások kifejlesztése
2. Daganaterozódás diagnosztikus, prognosztikus jelentősége és terápiás kiaknázása
3. Új melanóma diagnosztikumok és terápiás eljárások kifejlesztése
4. Terápia-individualizálás farmakogenomikai módszerekkel

Az alábbiakban a Konzorciumnak a pályázat elnyerése óta született eredményeiről nyújtunk összefoglalást.

1. Programcsomag: Molekuláris diagnosztikai szolgáltatások kifejlesztése

1.1. Örökletes daganatok predikciója és detektálása Magyarországon (Dr. Oláh Edit, OOI, Dr. Forrai Tamás, Zenon Bio Kft.)

Összesen 340 daganatos családot vizsgáltunk: 218 emlő- és petefészekrákos családban, 52 polipózisos szindrómában, 57 nem polipózis talaján kialakuló vastagbélrákos családban és 13 hererákos családban fejeztük be a hajlamosító gének elemzését. A gének valamennyi kódoló szekvenciájára kiterjedő mutációvizsgálatot a hagyományos SSCP, HDA és közvetlen DNS-szekvenálási módszerekkel végeztük. A konzorcium kisvállalkozó partnerével (Zenon Bio Kft.) szoros együttműködésben sikerült bevezetni két új mutációelemző módszert, a DHPLC és a nagy genomi deléciók azonosítására szolgáló MPLA módszert, abból a célból, hogy javítsuk az öröklött génmutációk költséghatékony kimutatását a BRCA1/2, APC, MLH1 és MSH2 génekre.

198 női- és 20 férfi emlőrákos családban végeztünk genetikai vizsgálatot a BRCA1 és BRCA2 gének öröklött mutációinak kimutatására. Eddig 20 családban sikerült mutációt azonosítani, további 21 DNS-szekvencia-eltérés funkcionális szerepét még tanulmányozzuk. Az utóbbi évben végzett mutációelemzések eredményei megerősítik korábbi megfigyeléseinket, amelyek szerint a BRCA1 gén meghibásodása gyakran a gén azonos szekvenciáját érinti, aminek következtében több családban is ugyanaz a mutáció fordul elő. Ezzel szemben ezt az

ügynevezett alapító hatást a BRCA2 génben kizárólag a magyarokban előforduló 9326insA mutáció és az askenázi zsidó származásúakra jellemző 6174delT mutáció esetében észleltük.

A CHEK2 egy, a sejtciklus ellenőrző mechanizmusában részt vevő "checkpoint" fehérje, mely fontos szerepet játszik a DNS-ben kódolt genetikai tartalom megóvásában. Célunk volt, hogy feltérképezzük a magyarországi emlőrákos populációban a CHEK2 csírvonalas mutációit különös tekintettel az 1100delC allélra. 147 olyan emlőrákos családot vizsgáltunk, ahol a betegség 60 éves kor előtt jelentkezett, és ennek ellenére nem találtunk BRCA1/2 csírvonalas mutációt. Azt a következtetést vonjuk le, hogy az 1100delC mutáció előfordulási gyakorisága Magyarországon nem jelentős, szűrése nem indokolt.

A vastag- és végbélrákok egyik legfontosabb kockázati faktorát a pozitív családtörténet jelenti, amely több tünetcsoportban is megnyilvánulhat. Ezek közé tartozik a familiáris adenomatózus polipózis, az MYH-asszociált polipózis, a Peutz-Jeghers-, valamint a juvenilis polipózis-szindróma. Vizsgálataink arra irányultak, hogy hazai családokban meghatározzuk a fenti szindrómák hajlamosító génjeinek (APC, MYH, STK11, SMAD4) magyarországi mutációs spektrumát, valamint értékeljük a genotípus és fenotípus esetleges összefüggéseit. A vizsgálatba beleegyező és genetikai tanácsadáson megjelent több mint 50 család tagjainak vérmintáiból DNS-t izoláltunk, majd a fenti gének teljes kódoló régióját kombinált mutációvizsgálatnak vetettük alá. A variánsokat direkt szekvenálással azonosítottuk. Azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a polipózis talaján kialakuló vastagbélrákos szindrómák kialakulásának hátterében hazánkban az esetek mintegy kétharmadában volt kimutatható az ezt okozó tumorsuppresszor gének mutációja.

57, nem polipózisos talaján kialakuló örökletes vastagbélrákos (HNPCC) család kombinált mutációvizsgálata (HDA/SSCP/MLPA/szekvenálás) alapján ezek 31,6%-a (18/57) hordozott patogén mutációt. Az azonosított 18 mutáció fele az MLH1, másik fele az MSH2 génben volt. A vizsgált populációban minden mutáció csak egyszer fordult elő, azaz alapító hatással nem találkozunk. A detektált mutációk fele új, azaz eddig még egyetlen populációból sem írták le. A mutációk jelentős része (4/18, 22%) genomi aberráció (nagy deléció vagy duplikáció), ezekből 1 az MLH1 génben, 3 pedig az MSH2-ben volt kimutatható. A betegség kialakulásával biztosan kapcsolatba hozható mutációkon kívül 7-féle besorolatlan variáns is találtunk (10 családnál, azaz a családok 17,5%-ában), ezek közül 2 (egy az MLH1-ben, egy az MSH2-ben) előzetes vizsgálataink szerint erősen valószínűsíthetően patogén.

A Hererák Konzorciummal végzett genom-elemzés után megállapítottuk, hogy az emlőrákok esetében megismert nagy penetranciájú genetikai változások nem játszanak szerepet a familiáris hererákos megbetegedések kialakulásában (Crockford és mtsai, 2006). Ugyanakkor a nemzetközi szakirodalomban az első olyan genetikai

változást írtuk le, amely mérsékelten fokozza a hererák kialakulásának kockázatát (Nathanson és mtsai, 2005).

1.2. Molekuláris diagnosztikai szolgáltatások fejlesztése (Dr. Szentirmay Zoltán, OOI, Dr. Soós Miklós, Auro-Science Kft., Dr. Józsa Adrienn, Roche (Magyarország) Kft.)

A follikuláris limfómák (FL) az összes non-Hodgkin-limfóma mintegy 30%-át teszik ki. FL-ban a daganatos klón t(14;18) kromoszomális transzlokációval jellemezhető. Az ilyen esetek több mint 90%-ában a Bcl-2 gén áthelyeződik az immunglobulin nehéz lánc (IgH) gén promoter régiójába. Follikuláris (és más alacsony malignitású) B-sejtes non-Hodgkin-limfómáknál, különösen előrehaladott stádiumban, a kezelés után gyakran relapszus következik be, amit jelenlegi ismereteink szerint a vérben és csontvelőben jelenlévő reziduális daganatsejtek (minimális reziduális betegség) okoznak. A klinikai vizsgálatok eredménye azt mutatja, hogy betegkövetés során a Bcl-2/IgH génátrendeződést hordozó daganatsejtek hiánya a csontvelőben vagy a perifériás vérben szignifikánsan hosszabb remisszióhoz vezet. A betegség molekuláris módszerekkel történő követésekor a PCR-rel kimutatott Bcl-2/IgH génátrendeződés szekvenciája a kiújulások során mindig azonos az eredeti FL klónban talált génátrendeződéssel. Ritkábban az is előfordul, hogy a kimutatott génátrendeződés nem azonos az eredeti MBR/JH fúziós szekvenciával. Ezért alapvető fontosságú annak meghatározása, hogy azok a sejtek, amelyekben a Bcl-2/IgH transzlokációt a perifériás vérben kimutattuk, azonosak vagy különböznek az eredeti daganatos klóntól. A PCR-rel amplifikált termék szekvenciaanalízise széles körben elfogadott, de egyúttal időigényes és drága módszere a probléma megoldásának. Ezért fluoreszcens olvadáspont-analízisre alapozott valós idejű PCR módszert dolgoztunk ki a kérdéses DNS-fragmentek analízisére. Tizenegy FL-ás beteg vér- és csontvelőmintáinak analízise közül három esetben volt kimutatható az eredeti nyirokcsomóban található génátrendeződéstől eltérő t(14;18) transzlokáció. Az általunk kidolgozott módszernek az a jelentősége, hogy a relapszus előrejelzése a klinikai tüneteknél sokkal korábban megtörténhet, a vizsgálat olcsó, gyors, más esetben pedig szükségtelenné válhat drága kezelés, ami nemcsak költséghatékony, hanem a beteg életminőségét is nagy mértékben javítja.

A neuroblasztómák rizikócsoportokba sorolása a klinikai stádium, a szövettani kép, a MYCN-státus és a sejtenkénti DNS-tartalom (DNS-ploidia) alapján történik. 32 műtéttel eltávolított neuroblasztómában valós idejű kvantitatív PCR (LightCycler) és kvantitatív dual-color-FISH módszerrel (Q-BIOgene) meghatároztuk a MYCN gén amplifikációjának mértékét. A sejtenkénti FISH-szignálszám vizsgálata a Központi Fizikai Kutatóintézet Anyagtudományi Intézetében Eördögh Imre és munkatársai által kifejlesztett színes kvantitatív képfeldolgozó rendszer (IMAN) segít-

ségével történt. Jelenleg a kétféle módszerrel (PCR, FISH) meghatározott MYCN-kópiaszámot hasonlítottuk össze. Nagyon jó lineáris pozitív korrelációt találtunk a FISH és LightCycler segítségével meghatározott MYCN-kópiaszám között.

Előzetes vizsgálataink arra utalnak, hogy a sporadikus vastagbélrákok prognózisát a lokalizáció és a TNM-re alapozott klinikai stádium mellett leginkább a BRAF gén V600E mutációja és mikroszatellita-státusa határozza meg. 206 beteg klinikai patológiai és genetikai adatait dolgoztuk fel. A DNS-mintákat fixálatlan vagy paraffinba ágyazott tumorszövetből izoláltuk. A mikroszatellita-instabilitást valós idejű kvantitatív PCR (LightCycler) módszerrel, olvadáspont-analízis segítségével vizsgáltuk és standard mikroszatellita-markereket használtunk. A BRAF-mutációt a laboratóriumban kifejlesztett LightCycler teszt és olvadáspont-analízis segítségével mutattuk ki. Az eredményt DNS-szekvenciaanalízissel is igazoltuk. Azt találtuk, hogy a vastag- és végbélrákok prognózisa leginkább az alábbi 4 paramétertől függ: klinikai stádium, lokalizáció, mikroszatellita- és BRAF-státus. Az MSI-H daganatok szignifikánsan jobb prognózissal, mint az MSS tumorok. Mutáns BRAF gén nem fordult elő 14 HNPCC-s beteg daganatában. A BRAF^{V600E} mutáció 7-szer gyakoribb MSI-H tumorokban (9/23), mint MSS rákokban (10/169). A BRAF^{V600E} mutációt hordozó vastagbélrákok sokkal kedvezőtlenebb biológiai viselkedést mutatnak, mint a BRAF-negatív tumorok. Az ilyen betegeknél tanácsos agresszív daganatellenes gyógykezelést alkalmazni már II. stádiumú tumorok esetén is, mert korai tumorstádiumban a betegek jelenleg nem kapnak kemoterápiát, ráadásul a mutáns BRAF elleni célzott kemoterápia is rövidesen rendelkezésre fog állni.

Magyarországon a női lakosság mintegy 25%-a genitálisan HPV-vel fertőzött, és az ilyen anyák újszülöttjeinek szájnyalkahártyájában sok esetben a vírus évek múlva is kimutatható. Több mint 100-féle HPV-típust azonosítottak, de ennek csak a fele okozza a nyálkahártyasejtek malignus átalakulását. A HPV-fertőzés kimutatásának népegészségügyi jelentőségét az alábbiak világítják meg: Nagy anyagon nemzetközi együttműködéssel végzett összehasonlító vizsgálatokban kimutatták, hogy a rákszűrésre alkalmazott cervixcitológiai vizsgálatok önmagukban a rákmegelőző közepes és súlyosfokú hámelváltozást (CIN 2/3) csak 53%-ban derítik fel, HPV-kimutatással kombinálva ez az arány 90-98%. Magyarországon 2007 elején kerül bevezetésre a leggyakoribb HPV-fertőzések (HPV 6, 11, 16, 18) megelőzésére szolgáló oltóanyag. Kérdés, hogy citológiai elváltozást nem, vagy csak enyhe elváltozást mutató fertőzések esetén a vakcina hatásos vagy sem? Hatásos-e a védőoltás a fenti négy típushoz genetikailag nagyon hasonló ezért azonos filogenetikai csoportokba tartozó további 15-féle papillomavírus-fertőzés vagy többszörös vírusfertőzés esetén is? A Konzorcium ipari partnere, a Roche (Magyarország) Kft. nagyon érzékeny ún. „Linear Array HPV Genotyping Test”-et fejlesztett ki, amellyel eddig összesen 59 vizsgálatot végeztünk, és az

eredményeket a saját korábban kifejlesztett PCR-alapú HPV-tesztünkkel összevetettük. Az array-HPV-teszt a sajátunknál sokkal érzékenyebbnek és megbízhatóbbnak mutatkozik a HPV-fertőzések, különösen a többes vírusfertőzések kimutatásában. Saját HPV-tesztünket rutinszerűen kívánjuk alkalmazni a cervixcitológiai minták vizsgálata során a méhnyakrákszűrés hatékonyságának növelésére és a HPV-vakcináció hatásosságának monitorizálására, míg az array-HPV-tesztet rendszeres minőségi kontrollként alkalmazzuk.

2. Programcsomag: Daganatereződés diagnosztikus, prognosztikus jelentősége és terápiás kiaknázása

2.1.3. Keringő angioblasztok kimutatása különböző típusú tüdőrákokban (Dr. Döme Balázs, Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet)

Napjainkig általánosan elfogadott volt, hogy a daganatok ereződése a már meglévő erek endoteliális sejtjei proliferációjának és a daganatba történő benövésének eredménye. Azonban egyre több adat áll rendelkezésünkre, amelyek ettől eltérő, a daganatok által indukált angiogenezis-mechanizmusokat írnak le. E mechanizmusok egyike a vaszkulogenezis, a csontvelői eredetű endoteliális prekursor sejtek (EPC-k) beépülése a daganatos erek endoteliális borításába. Ezek az őssejtek jól jellemezhetőek a sejtfelszínen megjelenő antigéneikkel: CD34, CD133, VEGFR2 és VE-cadherin. Azonban a daganatok angiogenezisében betöltött szerepük mértéke ma még nem egyértelműen tisztázott, a legtöbb daganatféleség esetében ismeretlen. Munkánkban nem-kissejtes tüdőrákos (NSCLC) betegek (53 páciens) perifériás vérében határoztuk meg a CD34+ /VEGFR2+ EPC-k számát áramlási citometriával a kezelések előtt és azt követően. Ezen felül kvantitatív PCR segítségével meghatároztuk a VEGFR2, CD34, CD133 és a VE-cadherin mRNS-expresszióját is a perifériás vérmintákban. Kísérleteink alapján elsőként javasoltuk a keringő EPC-k meghatározását tüdőrákos betegek monitorozására. Két diagnosztikus EPC-módszert is kidolgoztunk: az áramlási citometriás immuncitokémiai módszert és az ennél érzékenyebb molekuláris diagnosztikai módszert. Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy érzékeny módszereket dolgoztunk ki a tüdőrákok angiogén fenotípusának kimutatására (áramlási citometria+immuncitokémia illetve VEGFR2-qPCR), melyek alkalmasak a standard terápiás kezelés hatékonyságának monitorozására is. A kidolgozott módszereket nemzetközi közlemény validálja (Döme és mtsai, 2006).

2.2. Innovatív molekulatervezés felhasználása új anti-angiogenetikus szerek kifejlesztésére (Dr. Patthy László, MTA Enzimológiai Intézet)

Célunk a tumornövekedést és metasztázisok kialakulását gátló terápia kidolgozása céljából a tumor-angiogenezist megakadályozó, az $\alpha\beta3$ integrinen keresztül ható angiogenezis-inhibitorok

és receptoruk közötti kölcsönhatás vizsgálata. Néhány extracelluláris mátrixfehérje degradációjából származó fragmentről kimutatták, hogy gátolja az angiogenezist. A fehérjék angiogenezist gátló hatásának molekuláris mechanizmusát vizsgálva kiderült, hogy a fehérjék egy része integrinreken keresztül fejt ki hatását. A plazmin/angiosztatin és a zselatináz-A PEX doménje esetében az antiangiogenetikus hatással rendelkező fehérjefragmentek az $\alpha\beta3$ integrinhez kötődve gátolják a proteázok (plazmin, zselatináz A) kötődését, ezáltal mind a felszíni proteolízist, mind az integrinen keresztül kiváltott sejtproliferációt gátolják. A zselatináz-A PEX doménje és az $\alpha\beta3$ integrin receptor közötti kölcsönhatás szerkezeti hátterének és a jelátvitel mechanizmusának tisztázása révén várható, hogy kis molekulatípusú angiogenezis-inhibitorokat lehet kifejleszteni, melyek hosszan tartó tumorterápiában alkalmazhatóak. A PEX domén és receptora közötti kölcsönhatás jellemzéséhez szükséges a PEX domén és az integrin receptor fehérje extracelluláris régiójának előállítását. A munka első szakaszában a PEX domén és a receptorfehérje extracelluláris régiójának klónozását végeztük el.

2.3. Erythropoetin-indukált érelváltozások funkcionális jelentőségének elemzése daganatokban (Dr. Timár József, OOI, Dr. Romány Anna, Janssen-Cilag Kft.)

Régóta ismert tény, hogy a kevésbé oxigenizált tumorszövetek kisebb mértékben érzékenyek a sugárkezelésre és a kemoterápiára, ugyanakkor a rosszabb oxigénellátottság növeli az áttétképzés valószínűségét. Daganatos betegekben a tumorok és a kezelések miatt is gyakran lép fel anémia, amely jelentősen csökkenti a betegek életminőségét. Az anémia csökkentésére ma már rutinszerűen alkalmazzák az erythropoetint, amellyel a normális hemoglobinszintet próbálják elérni a betegekben. A kísérletes és klinikai eredmények azonban ellentmondások a rekombináns humán erythropoetin (rHuEPO) onkológiai alkalmazásának tekintetében. Több kísérleti eredmény azt mutatja, hogy az rHuEPO érzékenyíti a daganatokat a kemoterápiára, fokozza a tumorellenes immunválaszt, valamint egyedül is képes daganatregressziót okozni. Azonban néhány újabb megfigyelés ellentmond a pozitív eredményeknek. Jelenleg számos vizsgálat folyik rHuEPO-val a nem-kissejtes tüdődaganatok (NSCLC) esetében is a tumoros betegek kezelése során fellépő anémia korrekciójára. A korábban említett lehetséges negatív hatások miatt fontos kérdés annak tisztázása, hogy vajon e daganatféleség esetében van-e az rHuEPO-nak valamilyen szerepe közvetlenül, vagy különböző terápiákkal kombinálva. Preklinikai vizsgálatainkban humán nem-kissejtes tüdőrák-sejtvonalakon, valamint xenograft modelleken tanulmányoztuk az rHuEPO hatását. Immuncitokémiai és áramlási citométeres vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a különböző NSCLC-sejtvonalak az EPOR-t különböző mértékben expresszálják.

Ennek ellenére funkcionális vizsgálatainkban az rHuEPO-kezelés nem befolyásolta sejtvonalaink proliferációját, sem a gemcitabin proliferációgátló hatását *in vitro*. A kemoterápia *in vivo* hatásában szerepet játszhat az a korábbi megfigyelésünk más daganatfélésegeken, hogy az rHuEPO fokozza a tumor indukálta neoangiogenezisben érintett erek endotélsejtjeinek proliferációját, amely nagyobb érfelületet eredményez, és ezzel párhuzamosan emelkedik a tumorszövetek perfúziója. Az NSCLC xenograftokkal végzett vizsgálataink is azt mutatták, hogy a tumoros erek az rHuEPO-val kezelt daganatokban szignifikánsan nagyobb átmérőűek, amelynek az endoteliális sejtek proliferációjának fokozódása az oka.

Összefoglalva megállapítható, hogy preklinikai modellben emberi tüdőrákok *in vivo* növekedését nem befolyásolja az EPO-adagolás. Másrészt, szemben a korábbi vélelmekkel, az EPO-kezelés nem rontja emberi tüdőrákok kemoterápiás érzékenységét. Harmadszor, a kiegészítő antihypoxiás kezelés EPO-val fokozta a kemoterápia progresszió-fékező hatását. Mindezek a hatások a korábban más daganatban megfigyelt daganatos erekre gyakorolt EPO-hatásokon alapulnak (Tóvári és mtsai, 2005).

3. Programcsomag: Új melanóma-diagnosztikumok és terápiás eljárások fejlesztése

3.1. Melanómamarker azonosítása globális genomika segítségével (Dr. Tímár József, OOI.)

Korábbi NKFP programunk keretében jóindulatú melanocita-daganat (naevus) és humán melanóma-sejtvonalak génexpressziós mintázatát hasonlítottuk össze DNS-chip-módszerrel az SZBK chip-laborral kooperációban. A vizsgált 3.2 K-s platform minimum kétszeres valamennyi sejtvonalban megnyilvánuló, amúgy szignifikáns expressziós eltérés alapján emeltük ki a melanóma-ujjlenyomat génjeit. Ennek alapján 10 felülregulálódott és 4 alulregulálódott ismert gént találtunk. A ciklin E melanóma-specifikus marker-szerepét a pályázat elnyerése óta más csoport leírta (Bales és mtsai, 2005), ezért programunkat erre tekintettel módosítani kellett. Mindenesetre feltűnő volt, hogy a fokozottan expresszálódó gének közül 3 a Ca^{2+} -jelátvitelben érintett gén: a szív típusú ER- Ca^{2+} -csatorna RyR2, és annak két szabályozója, az FKBP12.6 és a sorcin. Első lépésben nested PCR-módszerrel megerősítettük az autentikus RyR2 gén expresszióját. 10-10 naevus és primer bőr melanóma esetében immuohisztokémiai módszerrel azt találtuk, hogy a RyR2 fehérje változó arányban, de csak a melanóma-mintákban volt jelen. A RyR2 funkcionális vizsgálata azért volt fontos, mert a fehérje marker szerepe mellett felmerült, hogy esetleg terápiás célpont is lehet. E célból specifikus ligandja segítségével mértük a Ca-tranzienst emberi melanocitákban és melanómasejtjeiben, de egyik esetben sem igazoltunk működő receptort.

Egy melanóma vonalban korábban leírták a Ca^{2+} -szignált indukáló P2X7 purinerg receptor

expresszióját. qPCR módszerrel azt találtuk, hogy mennyiségi különbség nincsen a melanociták és a melanómasejtek génexpressziós szintje között. Ugyanakkor protein szinten Western-blot segítségével is azt találtuk, amit az immuncitokémia mutatott, hogy a melanómasejtjeiben sokkal több P2X7 fehérje van jelen. A funkcionális vizsgálatok szerint a P2X7 melanocitákban nem működik, azonban mind a három melanóma-sejtvonalban Ca^{2+} -tranzienst váltható ki akár ismételt aktivitással is. Meglepő módon azt találtuk, hogy a RyR2 aktiválása gátolja a P2X7 működését. Funkcionális tesztheink ugyanakkor meglepő eredményre vezettek: a P2X7 nem-szelektív gátlása Zn^{2+} ionnal képes volt mérsékelten apoptózist indukálni a közismerten apoptózisrezisztens melanómasejtjeiben. Vizsgálataink arra utalnak, hogy emberi melanómasejtjeiben a P2X7 Ca^{2+} -csatornaként működik, és egyúttal hozzájárul a melanómasejtjei apoptózis-rezisztenciájának kialakulásához. Mindezek alapján jogosan merül fel az a lehetőség, hogy ez a Ca-csatorna potenciális terápiás célpont.

3.2. A melanóma áttétképzési képességét meghatározó genetikai konstellációk meghatározása (Dr. Tímár József, OOI.)

Korábbi NKFP pályázatunkban figyeltünk fel arra, hogy emberi melanómákban az EGFR expresszálódik, a sejtek ezt a fehérjét túlélésükhöz és migrációjukhoz használják, és hogy az EGFR-tirozinkináz konstitutívan aktivált állapotban van. Ez utóbbi jelenség arra utal, hogy a gén esetleg olyan károsodást szenvedett, aminek ez az eredménye. Ezért az általunk használt humán melanómavonalakban szisztematikusan elemeztük az EGFR gén szerkezetét, expresszióját és szekvenciáját.

Szekvenálással kimutattuk, hogy a melanóma-sejtvonalakban megfigyelt konstitutív EGFR-aktiváció oka nem a TK-domén mutációja.

Ezek után fordult figyelmünk az EGFR gén extracelluláris doménje felé, mert bizonyos daganatokban (pl. glioblastóma) ennek a szakasznak a mutációja igen gyakori, és a melanóma is neuroektodermális eredetű sejtéből indul ki. A vizsgált melanóma-sejtvonal-panelben az extracelluláris domént 7 primerpárral fedtük le és a PCR-termékeket megszekvenáltuk, valamint 28 primer melanóma esetében is vizsgáltuk az EGFR extracelluláris részét. A munka kiértékelése jelenleg is folyik.

Korábbi NKFP pályázatunkban felmerült, hogy humán melanómában a migrációs képességet a CMET onkogén terméke jelentősen befolyásolja/mediálja. Más daganatokban, pl. papillaris veserák, a CMET tirozinkináz szakaszának pontmutációja az onkogén konstitutív aktivációjához és daganat kialakulásához vezet. Régebbi kísérleti adatok arra utalnak, hogy kémiai karcinogének a CMET körüli kromoszómaszakasz törésével olyan fúziós gént hoznak létre, amely szintén konstitutív CMET-aktivációhoz vezet. Emberi daganatok közül ilyen fúziós gént a közelmúltban

gyomorrákban találtak. Mindezek alapján felmerült, hogy emberi melanómákban is genetikailag károsodott lehet a CMET gén. Ennek tisztázása céljából a rendelkezésünkre álló, genetikailag eltérő háttérű humán melanómavonalakban megszerveztük a CMET onkogén kitüntetett szerepet betöltő tirozinkináz doménjét 4, részben átfedő primerpár segítségével, valamint megvizsgáltuk, hogy a TRP-MET fúziós gén expresszálódik-e ezekben a sejtvonalakban. Vizsgálataink szerint a CMET TK doménje valamennyi melanóma-sejtvonalban kimutatható, autentikus méretű és vad típusú. Azt is megállapítottuk, hogy a TRP-MET fúziós gén nincsen jelen emberi melanóma-sejtvonalakban.

A gazdaszervezet melanóma áttétképzésében betöltött szerepének vizsgálatára beállítottunk egy olyan állatmodellt, amely alkalmas az áttétképzésben szerepet játszó tumor- ill. host/környezet (stróma) eredetű faktorok elkülönítésére. Mivel ebben a xenograft modellben a tumor humán eredetű, a stromális komponensek pedig a gazdaszervezethez tartoznak, megfelelően host-specifikus próbákat tartalmazó DNS-chipek segítségével külön vizsgálhatjuk a „tumor” gazdaszervezethez tartozó ill. a humán tumorból származó különbségeit, összehasonlítva az áttétképző (újszülöttbe implantált tumor) és a nem áttétképző (kifejlett állatba implantált tumor) primer tumorból származó gének expressziós mintázatát. Az összehasonlítást a fentieknek megfelelően az Agilent 20 000 egér gén expresszióját meghatározó Agilent Mouse Oligo Microarray (22,575 60-mer oligo) ill. a 41 000 humán gént meghatározó Whole Genome Oligo Microarray (44,000 60-mer oligo) segítségével végeztük el. A leolvasást követően a továbbiakban csak azon gének kiértékelésével foglalkoztunk, amelyek változása mindkét sejtvonal esetén azonos irányú volt és legalább kétszeres különbséget mutatott. Az eltérő expressziót mutató több mint 200 humán gén közül 96 validálását a Applied Biosystems real-time PCR elvén működő TaqMan kártyáival végeztük el. Így 41 gén bizonyult az eredeti mintákon ezzel az eltérő lokalizációba tervezett próbasorozattal is szignifikánsan eltérőnek a kétféle gazdaszervezetben növő humán tumorban. Ugyanezen nyomtatásból származó kártyák segítségével kvantitatívan meghatároztuk 21 fagyasztva tárolt műtéti humán melanóma-mintából e gének expresszióját. A minták közül 11 olyan betegből származott, akiben a követéses vizsgálatok tanúsága szerint a primer tumor eltávolítását követő 5 éven belül nem alakultak ki áttétek, míg 10 minta olyan betegekből, akikben igen.

A preklinikai modellekben igazolt 41 génből 5 gén expressziója mutatott a modellnek megfelelő irányú és kétszeres értéknél nagyobb mértékű változást abban az esetben, mikor az áttéteket nem hordozó betegekből származó tumorminták génextpresszióját viszonyítottuk az áttétet hordozó betegekéhez. Tekintve, hogy a humán mintákban a stromális komponenseket nem távolítottuk el a mintákból, ezek a génextpressziós változások

oly mértékben dominánsak, hogy nagyobb mintaszámon való tesztelést követően, visszaigazolván a protein szintű változásokat is, új prognosztikus faktorrá léphetnek elő humán melanómákban.

3.3. A melanóma progressziójának gátlása alacsony molekulásúlyú heparinnal (Dr. Mathiasz Dóra, GlaxoSmithKline Kft., Dr. Szilák László, Szilak Labor Kft.)

Saját korábbi vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy a kis molekulatömegű heparinnak (LMWH) is daganatellenes hatása van humán melanóma esetében. Az LMWH ugyan nem befolyásolja a sejtek proliferációját, de szignifikánsan csökkenti a melanómasejtek in vitro motilitását. In vivo xenograft vizsgálatainkban a tumoroltást megelőző és az azt követő 2-2 napon a humán antikoaguláns dózisban adott LMWH szignifikánsan csökkentette a melanómasejtek tüdőkolonizációs képességét, valamint lép-máj modellben a májmetasztázisok kialakulását. Ebben a folyamatban nem a tumorsejtek adhéziójának gátlása játszott nagyobb szerepet, ugyanis az LMWH-kezelés nem volt hatással sem in vitro a különböző mátrixkomponensekre adheráló, sem in vivo a tüdőszövetben kitapadó tumorsejtekre (Bereczky és mtsai, 2005). Felmerült a kérdés, hogy az 5000 daltonos LMWH igen heterogén cukorláncában azonosítható-e a specifikus antimetasztatikus hatásért felelős cukorszakasz és az jellemezhető-e kémiaiilag.

A manchesteri rákközpontban kollaborációs partnereink (Dr. Gallagher) által előállított különböző hosszúságú (4-22 cukoralegység) és pontosan jellemzett (szulfatáltság) LMWH-eredetű oligoszacharidokat teszteltük a korábbi vizsgálati rendszereinkben. Megállapítottuk, hogy a vizsgált 10 oligoszacharid (DP4-22) különböző módon befolyásolja humán melanómasejtek (HT168-M1) in vitro proliferációját és migrációját. Vannak olyan anyagok, amelyek egyike sem hatnak (p-m-), vannak olyanok, amelyek mindkettőt gátolják (p+m+) és vannak olyanok, amelyek csak a migrációra való képességet csökkentik (p-m+). A három megfigyelt tulajdonságnak megfelelően választottuk mindegyikből 1-1 anyagot; p-m: DP22, p+m+: DP18, és p-m+: DP4. Ezekkel az anyagokkal a tumor oltását megelőző és az azt követő 1-1 napban (összesen 3 alkalommal) kezeltük intraperitoneálisan az állatokat, majd a humán melanómasejteket a farokvénába oltottuk. A kialakult tüdőkolóniákat az oltást követő 7. héten számoltuk le. Megállapítható, hogy az in vitro migrációt gátló oligoszacharidok szignifikánsan gátolják a humán melanómasejtek in vivo tüdőkolonizációját preklinikai modellben. Megjegyzendő, hogy ezen oligoszacharidoknak nincs antikoaguláns hatásuk. Véleményünk szerint sikerült azonosítanunk a heparin egy olyan rövid oligoszacharid láncát, amely szelektíven képes a humán melanóma migráció-gátlására, míg más heparin-szerű hatással nem rendelkezik. Az oligoszacharidok pontos kémiai sajátosságai ismeretében megindítottuk a szabadalmaztatási folyamatot angol partnereinkkel.

4. Programcsomag: Terápia-individualizálás farmakogenomikai módszerekkel

4.1. Növekedésifaktor-receptor és hormon-receptor kölcsönhatás farmakogenomikája emlő- és fej-nyaki daganatokban

(Dr. Csuka Orsolya, OOI, Dr. Józsa Adrienn, Roche (Magyarország) Kft.)

A tirozinkinázok fokozott expressziója illetve mutációja lényeges szerepet játszik a daganatok metasztázis-képzésében, a sejtproliferáció állandósulásában és a terápiás érzékenység meghatározásában. Ennek alapján a tirozinkinázok az úgynevezett célzott terápia kitüntetett géncsaládjának tekinthetők. A tirozinkinázok gátlására alapozó daganatterápia előfeltétele az, hogy a kezelendő daganat tirozinkináz-mintázatát meghatározzuk. A vizsgálati periódusban 65 HER2+ és 35 HER2- emlőtumor-szövetmintát és 78 fej-nyaki daganatot (32 szájüregi-, 28 szájgarat-, 23 gége-rák) vizsgáltunk egy 53 kinázt reprezentáló makroarray segítségével. Megállapítottuk, hogy a HER2-amplifikált emlőrások eltérő tirozinkináz-expressziós mintázattal rendelkeznek, mint a normális HER2 gént tartalmazó daganatok. A fej-nyaki rákok vizsgálata során pedig azt találtuk, hogy az igen hasonló szövettani szerkezetű daganatok a különböző anatómiai lokalizációkban jelentősen eltérő kináz-mintázatot mutatnak. Ennek alapján e daganatok terápiás kezelésére is eltérő protokollt kellene alkalmazni.

Az emlődaganatok szervspecifikus metasztázisában a csontrendszer kitüntetett szerepet játszik. A csontmetasztázis korai felfedezésére olyan szérummarkerek alkalmazása szükséges, amelyek a csontmetasztázis valószínűségét a progresszió korai fázisában már jelzik. Vizsgálatainkban ennek megfelelően emlőtumoros betegekből vérmintákat gyűjtöttünk, és szérumot preparáltunk. A szérumból osteocalcin, parathyroid hormon (PTH), béta-CrossLaps és protokollagén amino-terminális propeptid (total P1NP) meghatározását vezettük be. Vizsgálataink alapvető célkitűzése az volt, hogy a nem daganatos személyek vérmintáiban a csontmarkerek normális értékeit meghatározzuk. Vizsgálatainkat a Modulare 170 Immunkémiai Automata (Roche) készülékkel végeztük. 444 posztmenopauzális személy vérmintáinak analízise alapján megállapítottuk, hogy az összes P1NP átlagértéke 40,43 ng/ml-nek felel meg. A hormonpótlás-terápiában részesült páciensek száma 154 volt, e személyeknél az átlagérték 31,74 ng/ml P1NP, míg a hormonpótlás-terápiában nem részesülő személyeknél magasabb, 45,05 ng/ml volt. A 129 premenopauzális személy szérummintáinak vizsgálata alapján az összes P1NP átlagértéke 30,1 ng/ml-nek bizonyult. Megállapítást nyert, hogy a premenopauzális személyek szérum-osteocalcin értéke 11-43 ng/ml között változott. Posztmenopauzális személyeknél az osteocalcin szérumértéke 15-46 ng/ml érték közé esett. A PTH normális szérumban mért értéke 15-65 pg/ml közé esett. A béta-CrossLaps (egyes típusú kollagén degradációs

terméke) szérumértéke premenopauzális személyeknél (254 fő átlaga) 299 pg/ml-nek, posztmenopauzában (429 fő) 556 pg/ml-nek bizonyult.

4.3. Daganatok antraciklin-terápiájának monitorozása non-invazív molekuláris képalkotó eljárással (Dr. Kásler Miklós, OOI, Dr. Soós Miklós, Auro-Science Kft.)

Az antraciklinek a korszerű daganatterápia alapvető alkotórészei napjainkban, így meghatározó elemei az emlőrások adjuváns, de újabban neoadjuváns terápiájának is. Különös hangsúlyt ad az emlőrások antraciklin-kezelésének az a tény, hogy kiderült, a HER2-amplifikált emlőrás nemcsak az anti-HER2 antitest-terápiának a molekuláris célpontja. Újabb adatok szerint a HER2-amplifikáció által érintett régió a 17. kromoszómán gyakran magába foglalja a TOPO2A által kódolt régiót is, tehát ezekre a daganatokra HER2/TOPO2A-amplifikáció jellemző. Ennek a következménye, hogy e daganatok esetében a Herceptin-kezelést antraciklinekkel érdemes kombinálni, mert ennek a gyógyszer-családnak az egyik molekuláris célpontja a TOPO2. A kombináció egyik kritikája azonban az, hogy ennek mindkét alkotórésze kardiális mellékhatásokkal jár, és attól lehet félni, hogy egymást esetleg potenciózzák is. Sokszor felmerült már korábban, hogy jó volna a kemoterápia során monitorozni a kezelés hatékonyságát és a gyógyszer farmakodinamikáját, azonban az erre alkalmas módszerek invazívak, illetve radioaktív izotópokat használnak, tehát szükség volna non-invazív, egyszerű és gyors, lehetőleg képalkotó módszerre. Mivel a citosztatikumok egyik legselesebb körben alkalmazott családjának tagjai (antraciklinek) fluoreszkáló molekulák, melyek széles spektrumban (zöld) gerjesztve széles spektrumú vörös fluoreszcens fényt emittálnak, ez lehetőséget ad arra, hogy a szervezetben, illetve a daganatos szövetben non-invazív módon is kövessük útjukat. Az emberi szövetek vizsgálatára azok autofluoreszcenciáját már használják. Ennek a non-invazív képalkotó diagnosztikájának a technológiája, illetve infrastruktúrája kialakult, amelyben a résztvevő partnerek (OOI és az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet) bizonyos tapasztalatra tettek szert. Másrészt megjelent e partnerek kezében a fotodinamias terápia, amely esetben a daganatszövetet fényérzékeny (adott esetben fluoreszcens) molekulával jelölik és pusztítják. Ez a technológia és annak infrastruktúrája is rendelkezésre áll.

Első lépésként immunhiányos SCID egereket kezeltünk 15 percig az antraciklin-származék epirubicinnel, humán terápiás dózisban. Fluoreszcens mikroszkópot használtunk annak megállapítására, hogy valóban ki tudjuk-e mutatni mikroszkópos eszközökkel az antraciklineket, azok fluoreszcens képességei alapján, szöveti szinten. A szívizomszövet vizsgálatával párhuzamosan a májból is készítettünk metszeteket, melyek vizsgálatához a magot kék fluoreszcens festékkel tettük láthatóvá (DAPI). Ezt a módszert 2005 végén már közöltünk (Tóvári és mtsai, 2005). Feltehetően a vérellátás egyenet-

lensége miatt inkább foltos volt a májlebenyekék jelölődése, és alacsony intenzitású volt a gyógyszer magi akkumulációja (a sejtmagokat DAPI magfestéssel kékre jelöltük). Ugyanakkor a kezelt állapotok szívében 15 perccel az epirubicin iv. beadása után a szívizomsejtek magjában 100% gyakorisággal mutatható ki az antraciklin a friss, fixálatlan fagyasztott metszetekben. Ehhez a mintát zöld gerjesztő hullámhosszú fényvel kellett megvilágítani, ekkor a gyógyszer vörös (590-615 nm) tartományban történő fluoreszcenciája alapján volt kimutatható, míg a szívizomsejtek zöldben jelölődtek a marker denzinnel. Mindkét minta esetében egyes területeken megfigyelhető volt a kötőszöveti sejtek, esetenként az ereket bélelő sejtek magjának vörös fluoreszcenciája is. Ugyanakkor megjegyzendő, hogy citoplazmatikus jelölődést e mintában egyáltalán nem észleltünk, ami arra utal, hogy a gyógyszer igen gyorsan jut be a normális szövetek sejtjeibe és ott igen specifikusan a sejtmagban DNS-hez kötődve akkumulálódik. Ennek alapján nem olyan nagy csoda, hogy fő mellékhatása a kardiotoxicitás.

Intézetünkben korábban klinikai vizsgálatok történtek egy nagyobb beteganyagon, amikor is előrehaladott stádiumú emlőrákos betegeket a sebészi kezelést megelőzően neoadjuváns kemoterápiában részesítették. A vizsgálatban első lépésként képalkotó vizsgálattal, majd core-biopsziával diagnosztizálták az emlőrákot, majd a betegeket antraciklin-tartalmú (epirubicin – FEC, adriamicin – FAC protokoll) kemoterápiás kombinációkkal kezelték 4 ciklusban 12 héten át (a kumulatív antraciklin-dózis 200 mg/m² volt). A kezelés után történt a daganat sebészi eltávolítása. Ezen beteganyag patológiai mintáin teszteltük azt, hogy az antraciklinek kimutathatók-e az emlőrákban a kezelés után. Erre a célra a primer diagnosztikus core-biopsziát használtuk fel kontrollként, majd ezt hasonlítottuk a daganat műtéti anyagához. A formalin-fixált paraffinos metszeteket deparaffináltuk, majd ezt a natív készítményt fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk a háttér zöld fluoreszcencia segítségével (strukturális orientáció). Ugyanakkor a korábban használt zöld gerjesztő hullámhossz mellett vizsgáltuk a mintákban az antraciklin vörös fluoreszcenciáját. Öt beteg esetében sikerült eddig elvégezni a pre- és posztoperatív minták összehasonlító vizsgálatát, akik antraciklin-tartalmú PAC, illetve epirubicin-tartalmú FEC, EC, illetve TXT-Epi kombinációs kezeléseket kaptak. A kezdő core-biopsziákban egyetlen esetben sem észleltünk a vvt-ken kívül más sejtes elem esetében erős magi vagy citoplazmatikus fluoreszcenciát. Ugyanakkor valamennyi műtéti minta esetében észleltünk specifikus szöveti antraciklin-fluoreszcenciát, amit vagy magukban a daganatsejtekben találtunk, vagy a daganatsejt-fészkek körüli makrofágok citoplazmájában, vagy a pusztuló daganatsejtek citoplazmájában. Feltűnő volt, hogy egyes fészkekben a daganatsejtek magja milyen erős magi vörös fluoreszcenciát adott, ami nagyon hasonlított ahhoz, amit kísérleti körülmények között korábban SCID egekbe oltott humán laphámrák esetében találtunk epirubicin beadása után 15 perccel (Tóvári és

mtsai, 2005). Felhívjuk a figyelmet arra, hogy ezekben az esetekben az antraciklin-vizsgálat az utolsó kezelés után 7 nappal történt. Mindezen vizsgálatok azt mutatják, hogy az antraciklin-kezelés után még napokkal is kimutatható szöveti szinten fluoreszcens mikroszkóppal az antraciklin.

4.4. Vastagbélrák kemoterápiájának farmakogenomikája (Dr. Kralovánszky Judit, OOI)

A colorectalis rákok (CRC-k) gyógyszeres kezelésében az 5-fluorouracil (5-FU) mellett az utóbbi 10 évben számos új gyógyszer (irinotecan, oxaliplatin, bevacizumab, cetuximab, stb.) került klinikai használatba, amelyek alkalmazása nagy anyagi terhet ró az egészségügyi finanszírozásra, ezért a gyógyszermegválasztás optimalizálása (maximális hatékonyság mellett minimális toxicitás) fontos egészségügyi és gazdasági érdek. Korábbi vizsgálatainkban (Hitre és mtsai, 2005) megállapítottuk, hogy az 5-FU molekuláris targetje, a timidilátszintáz (TS) génpolimorfizmusainak meghatározása az adjuváns kezelésre adott terápiás válasz, a betegségmentes és teljes túlélés predikcióját teszi lehetővé. A rossz prognózisú esetekben az 5-FU-kezelés más gyógyszerrel történő kiegészítése indokolt. A TS-polimorfizmusok mellett a TS aktivitását a folát kofaktor (5,10-metilén-tetrahidrofolát) is befolyásolja, ezért a folátanyagcsere egyéb enzimeinek farmakogenetikai vizsgálata is nélkülözhetetlen. Megállapítottuk, hogy a metiléntetrahidrofolát-reduktáz (MTHFR) C677T polimorfizmusa az 5-FU-kezelt metasztatikus CRC-s betegek esetében prognosztikai értékkel bír. A rosszabb prognózisú CC genotípusok esetében az 5-FU mellett irinotecan vagy oxaliplatin adása javasolható. A folátanyagcsere másik kulcsfontosságú enzime a szerinhidroximetil-transzferáz (SHMT), amelynek C1420T polimorfizmusa befolyásolja a plazma folátszintjét. A fent emített új gyógyszerek közül az irinotecan súlyos, elsősorban a gastrointestinális rendszert érintő mellékhatásainak kialakulásában fontos szerepet játszanak az UDP glukuronát-transzferáz gén polimorfizmusai, melyek közül az UGT1A1*28 a májban keletkező aktív metabolit, az SN-38 inaktiválását végzi. Az oxaliplatin hatékonyságát nagymértékben csökkentő rezisztencia kialakulásában pedig a nukleotidexcíziós repair (NER) géncsalád tagja, az XPD (ERCC2) gén polimorfizmusai tehetők felelőssé. A jelen pályázatban vállalt munkánk célja több, a CRC-k kezelésében alkalmazott gyógyszer metabolizmusában szereplő gén polimorfizmusának vizsgálatával egy olyan rutinszerűen alkalmazható és a klinikum részére javasolható vizsgálati rendszer kidolgozása, amelynek alapján az orvos egyénre szabottan dönt a beteg kemoterápiás kezelésében alkalmazott gyógyszerekről, azok alkalmazási sorrendjéről.

Az MTHFR A1298C polimorfizmust 567 CRC-s beteg és 249 egészséges kontroll esetében PCR technikát követő RFLP-vel határoztuk meg. A vizsgált betegekben és a kontroll populációban az MTHFR A1298C genotípus megoszlása megfelel a Hardy-Weinberg eloszlásnak, a két csoport között szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk.

Az SHMT C1420T genotípusát valós idejű PCR (MGB-primer) módszerrel határoztuk meg. A genotipizált 167 metasztatikussal CRC-s beteg közül 102 beteg 5-FU- és 65 beteg 5-FU+ irinotecan (FOLFIRI) terápiában részesült. A betegek esetében a medián követési idő 26 ± 18 hónap volt. A genotípus-megoszlást a következőknek találtuk: CC – 80, CT – 74 és TT – 13 beteg. A kezelésre adott objektív klinikai válasz (CR+PR+SD) szignifikánsan jobbnak bizonyult ($p=0,02$) a FOLFIRI kezelés esetén. A T alléllal rendelkező (CT+TT) betegek esetében az objektív klinikai válasz 20%-kal volt magasabb. A Kaplan-Meier-módszerrel értékelt progressziómentes és teljes túlélés szignifikánsan hosszabbnak bizonyult a FOLFIRI kezelést kapott CT+TT genotípusú betegek esetében a csak 5-FU-kezelésben részesültekhez viszonyítva. A többváltozós Cox regressziós analízis igazolta, hogy a T alléllal rendelkező betegek esetében a FOLFIRI kezelés a relapszusrizikót mintegy 50%-kal csökkentette az 5-FU-kezeléshez képest.

A fenti vizsgálati eredmények alapján megállapítható, hogy az SHMT C1420T polimorfizmus vizsgálata fontos információt szolgáltat az onkológus részére a választandó kezelés eldöntésekor. A CT és TT genotípusú betegek esetében választott kombinált 5-FU+ irinotecan kezelés hosszabb betegségmentes túlélést, kezelésmenetséget eredményez, és ezáltal csökkennek az egészségügy anyagi ráfordításai.

Irodalom

1. Timár J. A Nemzeti Onkológiai Kutatás-fejlesztési Konzorcium első évi tevékenysége. *Magyar Onkológia* 46:297-300, 2002
2. Timár J. Beszámoló a Nemzeti Onkológiai Kutatás-fejlesztési Konzorcium 2003. évi tevékenységéről. *Magyar Onkológia* 48:75-79, 2004
3. Timár J. Beszámoló a Nemzeti Onkológiai Kutatás-fejlesztési Konzorcium 2004. évi tevékenységéről. *Magyar Onkológia* 49:3-7, 2005
4. Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, Penault-Llorca F, van der Vijver M, Parry S, Bishop T, Benitez J, Rivas C, Bignon YJ, Chang-Claude J, Haumann U, Cormelisse CJ, Devilee P, Beckmann M, Nestle-Krämling C, Daly PA, Haites N, Varley J, Lalloo F, Evans G, Maudgaur S, Fiche M, Meijers-Heijboer H, Klijn JGM, Olah E, et al. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and 'basal' phenotype. *Clin Cancer Res* 11:5175-5180, 2005 (1. programcsomag)
5. Andrieu N, Goldgar DE, Easton DF, Rookus M, Brohet R, Antoniou AC, Peock S, Evans G, Eccles D, Douglas F, Nogués C, Gauthier-Villars M, Chompret A, Van Leeuwen FE, Kluij I, Benitez J, Arver B, Olah E, Chang-Claude J, EMBRACE, GENEPSO, GEO-MEBON IBCCS Collaborators Group. Pregnancies, breast-feeding, and breast cancer risk in the International BRCA1/2 Carrier Cohort Study (IBCCS). *J Natl Cancer Inst* 98:535-544, 2006 (1. programcsomag)
6. Crockford G, Linger R, Hockley S, Dudakia D, Johnson L, Huddart R, Tucker K, Friedlander M, Phillips KA, Hogg D, Jewett MAS, Lohynska R, Daugaard G, Richard S, Chompret A, Bonaiti-Pellié C, Heidenreich A, Albers P, Olah E, Geczi L, Bodrogi I, Ormiston WJ, Daly PA, Guilford P, Fossá SD, Heimdal K, Tjulandín SA, Liubchenko L, Stoll H, Weber W, Forman D, Oliver T, Einhorn L, McMaster M, Kramer J, Greene MH, Webe BL, Nathanson KL, Cortessis V, Easton DF, Bishop DT, Stratton MR, Rapley EA. Genome-wide linkage screen for testicular germ cell tumour susceptibility loci. *Hum Mol Genet* 15:443-451, 2006 (1. programcsomag)
7. Csernák E, Tóth E, Melegh Z, Schneider T, Rosta A, Szentirmay Z. Detection and quantification of MBR/JH2 t(14;18) BCL-2 gene rearrangement in follicular lymphoma using a combined real time polymerase chain reaction assay. *Haematologica* 91:858-859, 2006 (1. programcsomag)
8. Rényi-Vámos F, Tóvári J, Fillinger J, Timár J, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Agocs L, Soltész I, Döme B. Lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis, prognosis, and angiogenic phenotype in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 11:7344-7353, 2005 (2. programcsomag)
9. Döme B, Timár J, Dobos J, Mészáros L, Rásó E, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Magyar M, Ladányi A, Bogos K, Tóvári J. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 66:7341-7347, 2006 (2. programcsomag)
10. Tóvári J, Gilly R, Rásó E, Paku S, Bereczky B, Varga N, Vágó Á, Timár J. Recombinant human erythropoietin α targets intratumoral blood vessels, improving chemotherapy in human xenograft models. *Cancer Res* 65:71186-71193, 2005 (2/4. programcsomag)
11. Bereczky B, Gilly R, Rásó E, Vágó Á, Timár J, Tóvári J. Selective antimetastatic effect of heparins in preclinical human melanoma models is based on inhibition of migration and microvascular arrest. *Clin Exp Metast* 22:69-76, 2005 (3. programcsomag)
12. Timár J, Tóvári J, Rásó E, Mészáros L, Bereczky B, Lapis K. Platelet-mimicry of cancer cells: epiphenomenon with clinical significance. *Oncology* 69:185-201, 2005 (3. programcsomag)
13. Lőrincz T, Tóth J, Szendrői M, Timár J. Microvascular density of breast cancer in bone metastasis: influence of therapy. *Anticancer Res* 25:3075-3082, 2005 (4. programcsomag)
14. Lőrincz T, Tóth J, Badalian G, Timár J, Szendrői M. Her2/neu genotype of breast cancer may change in bone metastasis. *Pathol Oncol Res* 12:149-152, 2006 (4. programcsomag)
15. Timár J, Csuka O, Remenár É, Répássy G, Kásler M. Progression of head and neck squamous cell cancer. *Cancer Metast Rev* 24:107-127, 2005 (4. programcsomag)
16. Hitre E, Budai B, Adleff V, Czeglédi F, Horváth Z, Gyergyai F, Lövey J, Kovács T, Orosz Z, Láng I, Kásler M, Kralóvánszky J. Influence of thymidilate synthase gene polymorphism on the survival of colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Pharmacogenomics* 15:723-730, 2005 (4. programcsomag)

A Konzorcium közleményei (2005-2006)

1. Nathanson KL, Kanetsky PA, Hawes R, Vaughn DJ, Letrero R, Tucker K, Friedlander M, Phillips KA, Hogg D, Jewett MA, Lohynska R, Daugaard G, Richard S, Chompret A, Bonaiti-Pellié C, Heidenreich A, Olah E, Geczi L, Bodrogi I, Ormiston WJ, Daly PA, Oosterhuis JW, Gillis AJ, Looijenga LHJ, Guilford P, Fossá SD, Heimdal K, Tjulandín SA, Liubchenko L, Stoll H, Weber W, Rudd M, Huddart R, Crockford GP, Forman D, Oliver DT, Einhorn L, Weber BL, Kramer J, McMaster M, Greene M, Pike M, Cortessis V, Chen C, Schwartz SM, Bishop DT, Easton DF, Stratton MR, Rapley EA. The Y deletion GR/GR and susceptibility to testicular germ cell tumor. *Am J Hum Genet* 77:1034-1043, 2005 (1. programcsomag)
2. Antoniou AC, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loma N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjäkoski H, Kllioniemi OP, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG, Easton DE et al. Breast and ovarian cancer risks to carriers of the BRCA1 5382insC and 185delAG and BRCA2 6174delT mutations: a combined analysis of 22 population based studies. *J Med Genet* 42: 602-603, 2005 (1. programcsomag)